

## ⑪ 公開特許公報 (A)

平3-164168

⑤Int.Cl.<sup>5</sup>  
C 12 N 5/08

識別記号

府内整理番号

⑩公開 平成3年(1991)7月16日

6807-4B C 12 N 5/00

E

審査請求 未請求 請求項の数 11 (全9頁)

## ⑪発明の名称 細胞組織の増殖方法

⑩特 願 平2-115346

⑩出 願 平2(1990)5月2日

優先権主張 ⑩1989年5月4日⑩米国(US)⑩347448

⑪発明者	ジョゼフ・イー・ガブ リエルズ・ジュニア	米国マサチューセッツ州ブランドン、トラベロ・ストリー ト28
⑩出願人	ミリボア・コーポレイ ション	米国01730マサチューセッツ州ベドフォード、アシュビ ー・ロード80
⑩代理	弁理士 倉内 基弘	外1名

## 明細書の序(内容に変更なし)

## 明細書

## 1. 発明の名称 細胞組織の増殖方法

## 2. 特許請求の範囲

1. 1種の細胞タイプからインピトロで組織を製造する方法であって、

a. 細胞を成長させるのに適した多孔性基質に、該細胞をインピトロで成長させる特異的成長因子を接觸させ、  
 b. 次いで、多孔性基質に細胞を接種し、  
 c. 接種した多孔性基質を細胞成長に適した条件下に保ち、それで融合性単層の組織或は均一に分化した多層組織を製造する工程を含む方法。

2. 多孔性基質が微孔性ポリマー膜である特許請求の範囲第1項記載の方法。

3. 微孔性ポリマー膜にコラーゲンを被覆する特許請求の範囲第1項記載の方法。

4. 更に、

- a. 細胞を成長させるのに適した多孔性基質を処理し、それで成長因子を結合させるための活性化部位をもたらし、
- b. 多孔性基質に該細胞を成長させる特異的成長因子を含む細胞培地を、成長因子を基質内に分散させる条件下で接觸させ、
- c. 基質から媒質を取り去って媒質フリー基質とし、
- d. 媒質フリー基質に成長因子及び非特異性たんぱく質を含む細胞培地を、残留する活性化部位を緩和する程の量で接觸させ、
- e. 次いで、多孔性基質に細胞を接種し、
- f. 接種した多孔性基質を細胞成長に適した条件下に保ち、それで融合性単層の組織或は均一に分化した多層組織を製造する工程を含む特許請求の範囲第1項記載の方法。
- 5. 前記細胞がケラチノサイト細胞である特許請求の範囲第1項又は第4項記載の方法。
- 6. 特許請求の範囲第1項又は第5項記載の方法によって製造された組織。

7. a. コラーゲン被覆微孔性基質に表皮成長因子及び成長因子を中に含有する下垂体性エキストラクトを含む細胞培地を、成長因子を基質内に分散させる条件下で接触させ、  
 b. 基質フリーの微孔性基質に血清、表皮成長因子及び成長因子を中に含有する下垂体性エキストラクトを含む細胞培地を、残留する活性化部位を飽和する程の量で接触させ、  
 c. 次いで、微孔性基質にケラチノサイト細胞を接種する

工程を含む特許請求の範囲第4項記載の方法。

8. 1種の細胞タイプから組織を成長させるための基質の製造方法であって、  
 a. ポリマー微孔性基質を処理し、それで成長因子を結合させる活性化部位をもたらし、  
 b. 微孔性基質に細胞を成長させる特異的な成長因子を含む細胞培地を、成長因子を基質内に分散させる条件下で接触させ、

イト細胞から組織をもたらし、  
 b. ある量の基質を組織に施して基質への細胞反応を観測し、  
 c. 反応を評価して基質の毒性作用を求める

工程を含む方法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### 産業上の利用分野

本発明は細胞組織の増殖方法に関する。

#### 従来の技術

組織源の異なる哺乳類細胞を培養する方法は数多く報告されているが、これらの細胞の多くはインビトロで成長させるのが困難であり、かつ成長させてもインビトロ組織に形態学的に似ていない。

Green 及び Reinwald (米国特許 4,016,036 号、1977年) は有糸分裂的に抑制された線維芽細胞の存在において成長させたケラチノサイト細胞を過剰して培養する手順を記載している。第2細胞タイプ (例えば、3T3 線維芽細胞がない場合、ケラチノ培養は均一でもなく分化し

c. 基質から媒質を取り去って媒質フリー基質とし、  
 d. 媒質フリー基質に成長因子及び非特異性たんぱく質を含む細胞培地を残留する活性化部位を飽和する程の量で接触させ、それで融合性単層の組織或は均一に分化した多層組織を成長させるための基質を製造する工程を含む方法。

9. 微孔性ポリマー膜基質がコラーゲンを被覆した微孔性膜である特許請求の範囲第8項記載の方法。

10. 特許請求の範囲第8項記載の方法によって製造された細胞から組織を成長させるための基質。

11. 基質が組織に与える毒性作用を求める方法であって、

a. 特許請求の範囲第7項記載の方法によって製造された細胞を成長させる特異的な成長因子を有する細胞を成長させるのに適した微孔性基質において成長させたケラチノサ

てもいなかった。この方法で作った組織をインビトロ毒物学及びその他の研究用に用いることの主な不利な点は線維芽細胞が存在することである。線維芽細胞は有糸分裂的に抑制されるが、依然代謝活性である。それ故、線維芽細胞の代謝活性及び/又は細胞成分は研究中の細胞についてのアセイを妨げる。

Woodley 及び共同研究者等 (Joint Meeting of Amer. Chem. Soc. Cell Biol. 及び Amer. Soc. Biochem. Mol. Biol., Abstract 4536,

798a頁、1月29日-2月2日、1989年、カリフォルニア、サンフランシスコ) は、第2セルタイプを用いないでケラチノサイト細胞をコラーゲン上で成長させる方法を記載している。表皮成長因子及び牛下垂体エキストラクトを含有する媒質を用いて細胞成長を促進させた。しかし、この方法で成長させた表皮組織は、組織に栄養を供給する手段がないので、空気/液体界面に上げることができない。

Bernstan, I.L. 等 (In Vitro Cell Dev.

Biol. 22巻、695～704頁(1986年)にケラチノサイト細胞を空気／液体界面において成長させる方法を記載した。コラーゲン基質上で成長させた細胞は融合性単層を産生したが、層化の不均等領域は観察されなかった。

これより、インピトロ毒物学及び他の研究(例えば、経表皮性(transepidermal)薬剤輸送)用のインピボ対応物に形態学的に類似した組織を製造することが望ましい。

#### 発明の構成

本発明は組織をインピトロで製造する方法及び組織を成長させるための基質に関する。特に、多孔性細胞成長基質に、感心のある細胞、例えばケラチノサイト細胞、上皮細胞、内皮細胞を成長させる特異的な成長因子を含む細胞培地を接触させて細胞からの組織を製造する。次いで、成長因子と基質とを、成長因子を基質内に或は基質に分散させる条件下で接触させる。細胞成長基質は細胞成長支持物質、例えばコラーゲンを被覆した微孔質膜を含むのが好ましい。次いで、細胞を細胞

せてなる毒生物学キットに関する。代って、キットは細胞成長基質及び基質上で成長させる同心のある細胞を含む。

#### 発明の詳細な説明

本発明の方法によって組織を製造するのに適した細胞は下記を含み、これらに制限されない:任意の組織源、例えば角膜上皮及び肺上皮細胞のケラチノサイト細胞、肝細胞、神経細胞、内皮細胞及び上皮細胞。細胞は任意の天然組織源(哺乳類或はその他の細胞源)からにすることができる或は遺伝子工学的に作り出すことができる。「組織」なる用語は、本明細書中、成長させて層化及び末端分化することができる融合性均一単層或は多層組織を形成する細胞の組織を意味することを意図する。

細胞成長基質は細胞を増殖及び分化させてインピボ組織に類似した組織を生成するのに重要である。多孔性細胞成長基質とは、本明細書中、細胞成長を支持する任意の基質であると規定する。適した細胞成長基質は細胞、特に組織の基底細胞へ

成長基質に接種し、それで細胞は成長因子に接触するか或は極めて接近して細胞培養を形成する。接種した細胞成長基質を細胞成長に適した条件下で保ち、それで組織を产生させる。本発明の方法によって产生させた組織は細胞の融合性単層になることができ、或は細胞の分化した多層になることができる。融合性単層の形成からの及び層化及び末端分化の段階を通しての組織成長の種々の段階は、細胞成長させる条件を扱うことによって達成することができる。培養は培地に浸して成長させることができ或は空気／液体界面に上げてインピボ状態をまねることができる。どちらの場合でも、細胞は基体に一様に分布され、均一に層化されかつ末端分化された組織を形成する。本発明の方法によって製造した組織はインピボ対応物に十分形態学上類似しており、それでインピトロ毒生物学用に有用である。

本発明は、また、基質が本発明の方法によって製造する組織に与える毒性作用を求める方法及び組織を成長因子を有する細胞成長基質上で成長さ

の栄養の拡散を容易にさせることができる多孔性構造を有する。例えば、多孔性細胞成長基質は培地に接して空気／液体界面に上げられた組織に十分な栄養分を供給することができる。細胞成長基質は任意の多孔性の天然或は合成ポリマー、例えばコラーゲン、セルロース系膜、ポリカーボネート、ポリテトラフルオロエチレン、ナイロン膜、ナイロンメッシュにすることができる。細胞成長基質として使用することができる他の多孔質物質はガラスフィルター、セラミックにことができる。細胞成長基質は微孔性膜を含むのが好ましい。特に適した1種の支持材は Millipore-Millipore CM (商標) 微孔性インサート(マサチューセッツ、ベドフォード在ミリポアコーポレーション)である。膜に加えて、フィルターを使用することができかつ発明の範囲内に含む。好ましい実施態様では、細胞成長基質に細胞成長支持物質、例えばコラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンを被覆する。

多孔性細胞成長基質の表面は細胞成長に有利で

なければならない。特に、細胞成長基質は下記の理由で成長を支持する：その天然性が十分である；或は細胞成長性をもたらすように処理される；或は細胞成長支持物質、例えばコラーゲンが被覆される。基質の表面を次いで活性化して成長因子を結合させる部位をもたらす。

一実施態様では、多孔性細胞成長基質を（化学的或は非化学的に）処理して成長因子を細胞成長用基質に結合させる活性部位をもたらすことができる。細胞成長基質を処理して成長因子を付着させるための活性部位をもたらす方法は基質に依存する。成長因子は感心のある細胞の成長を促進させる任意の分子、例えば細胞特異性成長因子（例えば、表皮成長因子）、ホルモン、細胞培地、ペプチド、炭水化物、糖たんぱく質である。

別の実施態様では、細胞成長基質に細胞成長支持物質を被覆し、該物質を処理して成長因子を結合させる。適した細胞成長支持物質はたんぱく様物質、例えばコラーゲン、ゼラチン、ラミニン、フィブロネクチンである。細胞成長基質にコラーゲンを被覆する場合、コラーゲンをグルテルアルデヒド或はその他の架橋剤で架橋することによって化学的に処理して成長因子を結合させる活性部位をもたらすことができる。非化学的方法、例えば、放射線暴露を用いて基質上の部位を活性化することができる。

感心のある細胞に特異的な成長因子を含む細胞培地と、成長因子を基質内に分散させる条件下で接觸させる。細胞培地は1種のタイプの成長因子を含有することができ或は感心のある細胞に特異的な異なるタイプの成長因子を数多く含有してもよい。成長因子を基質全体にわたって分散させることができ或は実際に細胞に接することになる基質の領域、例えば細胞成長基質の表面に分散させることができる。基質に架橋されたコラーゲンを被覆する場合、成長因子はコラーゲン上に位置された活性化された部位に化学的に結合する（例えば共有結合によって）ものと考えられる。しかし、本発明は成長因子を基質に結合させる他の手段を

包含する。

基質上の活性化された部位を確実に不活性化或は無力化（neutralize）させておく（すなわち、全ての活性化部位に成長因子を結合させておく）ために、細胞培地を基質から取り出して成長因子及び非特異性たんぱく質を含む追加量の媒質を基質に接觸させて残留する活性化部位を飽和する。この段階は基質を急冷或は寒活し、基質内の成長因子の実質的に均一な分布を確実にする。非特異性たんぱく質は残留する活性化部位に結合することができる血清或はアルブミンにするのが好ましい。

細胞成長基質の表面を調製した後に、感心のある細胞を基質に接種し、それで細胞に成長因子を接觸させて細胞培養を形成する。接種した細胞成長基質を次いで細胞成長が単層シートの組織を產生するのに適した条件下に保つ。それ以上の細胞成長は、多層組織が分化されるに至る。細胞が何日間か成長した後に、培養を空気／液体界面に上げ、そこで細胞を分化させてそのインビオ対応

ゲンを被覆する場合、コラーゲンをグルテルアルデヒド或はその他の架橋剤で架橋することによって化学的に処理して成長因子を結合させる活性部位をもたらすことができる。非化学的方法、例えば、放射線暴露を用いて基質上の部位を活性化することができる。

活性化された結合用部位を有する細胞成長基質と感心のある細胞に特異的な成長因子を含む培地とを、成長因子を基質内に分散させる条件下で接觸させる。細胞培地は1種のタイプの成長因子を含有することができ或は感心のある細胞に特異的な異なるタイプの成長因子を数多く含有してもよい。成長因子を基質全体にわたって分散させることができ或は実際に細胞に接することになる基質の領域、例えば細胞成長基質の表面に分散させることができる。基質に架橋されたコラーゲンを被覆する場合、成長因子はコラーゲン上に位置された活性化された部位に化学的に結合する（例えば共有結合によって）ものと考えられる。しかし、本発明は成長因子を基質に結合させる他の手段を

包含する。

細胞を漫濱培養として保つことができる。本発明の方法によって成長させた組織を次いで基質から取り出して収穫することができる。

好みの実施態様では、コラーゲンの層を被覆させた多孔性細胞成長基質、例えば微孔性膜を供給することによって、ケラチノサイト細胞からの組織を產生させることができる。コラーゲンを処理して（例えば、グルテルアルデヒドで架橋することによって）成長因子を結合させる活性化部位をもたらす。処理したコラーゲン被覆基質に、次いで表皮成長因子及び成長因子を中に含む下垂体エキストラクトを含む細胞培地を、成長因子を基質内に分散させかつ化学的に基質に結合させることができる条件下で接觸させる。表皮成長因子を含有する正常のヒト表皮ケラチノサイト（NHEK）及び牛下垂体エキストラクトを増殖させるための細胞培地が Boyce及び Ham（米国特許4,673,649号、1987年6月16日）によって記載され、かつ Clonetics, Inc.（カリフォルニア、サン

ジェゴ) によって Keratinocyte Growth Medium として改質された。

次いで、細胞培地を基質から取り出す。得られた媒質フリーの基質に血清及びカルシウムで改質した追加の媒質を接触させる。媒質の添加量は残留する活性化部位に成長因子及び/又は血清を飽和させ、それで基質を導活させ或は急冷する程のものである。一組基質を導活させたら、ケラチノサイト細胞を基質に接種して細胞培養を形成する。細胞接種密度は約  $1 \times 10^3$  ~ 約  $1 \times 10^4$  細胞/ $\text{cm}^2$  にすることができる。ケラチノサイト細胞は接種密度  $1 \times 10^3$  ~  $8 \times 10^3$  細胞/ $\text{cm}^2$  で接種するのが好ましい。培養を、ケラチノサイト細胞成長がケラチノサイト細胞を含有する組織を產生するのに適した条件下に保つ。空気/液体界面に上げる組織は層化し、末端分化した外皮になる。

薬剤、化学薬品、化粧品が哺乳類細胞に与える毒物学的作用は現在インピボで評価している。例えば、化粧品の毒性は、Draize眼刺激試験をうさ

インピボ組織に十分に形態学的に似るので、他の生理学的及び臨床的用途において、例えば組織への細胞発達、薬剤の薬理学的機構及び経皮輸送を研究するのに用いることができる。組織を、また、創傷、熱傷、等用の代替え組織として使用することができる。

インピトロ毒物学用キットは下記を含む：感心のある細胞を成長させるための特異的な成長因子を中に分散させた多孔性細胞成長基質：基質上で成長させた感心のある細胞からの組織：基質の毒性を求める試薬。基質は微孔性細胞成長基質に被覆した架橋コラーゲンゲルにし、かつ細胞は成長させて末端分化組織を產生するケラチノサイト細胞にするのが好ましい。が、組織は単層から層化多層組織までの細胞成長の種々の段階において容易に利用可能になることができる。

別の実施態様では、上記のキットは細胞成長基質に接種し、成長させ、それで細胞成長の任意の所望の段階で組織を產生することができる細胞の懸濁を含むことができる。細胞のない細胞成長基

ぎについて用いて試験する。このような試験の結果として、毒性試験に動物を用いることの公衆の意識及び非難が増大している。多くの国は、公衆の関心に答えて、動物を毒物学用に用いることを禁止した。こうして、薬剤及び化学薬品の毒性作用を検査する別の方法を開発しなければならない。

本発明の方法によって製造した組織を使用して、薬剤、化学薬品、化粧品等の基質の毒性作用を評価することができる。評価する基質を前述した通りにして細胞成長基質上で成長させた組織(成長及び分化の任意の段階における細胞からの組織)に施す。基質への細胞の反応を観察する。反応は細胞形態学の変化になり得るか又は細胞の化学変化の1種或はそれ以上になり得る。次いで、反応を評価して基質の毒性作用を求める。例えば、毒性作用の検査をする基質を層化し、末端分化した外皮に局所適用することができる。次いで、基質の毒性を評価することができる。

加えて、本発明の方法によって製造する組織は

質は凍結乾燥或は凍結させて販売することができる。キットは更に基質の毒性を求める試薬を1種或はそれ以上含むことができる。細胞成長基質を微孔性ポリマー膜にし、かつ細胞をケラチノサイト細胞にするのが好ましい。

発明を下記の例によって更に説明する。

例1. コラーゲン被覆した細胞成長基質でのケラチノサイト成長

コラーゲン被覆した細胞成長用基質の調製

ラット尾タイプI、約  $3 \text{ mg}/\text{ml}$  (マサチューセッツ、レキシントン在 Collaborative Research) からのコラーゲン2容量部を70%エタノール1部で希釈し、渦でよく混合した。生成した溶液は無菌であり、冷凍貯藏した後に使用することができた。

Millipore (商標) 多孔性基質インサート (マサチューセッツ、ベドフォード在 Millipore Corporation) を  $100 \text{ mm}$  ベトリ皿に入れた。12 mm 及び  $30 \text{ mm}$  Millipore CM インサートを収容するベトリ皿にコラーゲン/エタノール混

合物  $50\text{ }\mu\text{g}$  及び  $500\text{ }\mu\text{g}$  をそれぞれ加えた。濾水酸化アンモニウム 5 或は 6 滴をベトリ皿の周囲のまわりに入れた。次いで、ベトリ皿にふたをし、室温において 45 分間インキュベートしてコラーゲンをゲル化させた。

生成したコラーゲンを 70 % エタノールで 1 回洗浄した。コラーゲンゲルを含有する Millicell -CM インサートを 70 % エタノールに浸漬しかつ室温において 1 時間インキュベートしてゲルを脱水した。生成したゲルを Millicell -CM インサートに接触させて稠密ゲルを形成した。ゲルを滅菌水で 1 回すすぎ、次いでインサートを滅菌ホスフエート緩衝塩水 (PBS) でアスピレートして 3 回洗浄した。

### コラーゲンを架橋する

グルテルアルデヒドの25%水溶液をPBSに1:10で希釈してPBS中2.5%のグルテルアルデヒド濃度を生じた。生成した溶液を沪過して微粒子物を除いた。前の項に記載した Millicell-CH インサートからPBSを除いた。次いで、イ

ラーケンゲルを改質KGM溶液に1時間浸漬して  
架構コラーケンゲル上の残留活性部位を急冷し  
た。

### 細胞成長基質を接種する

正常のヒト表皮ケラチノサイト (NHEK) を Clonetics, Inc. からの二次細胞接種細胞株として得た。培養が 60 ~ 80 % の融合性になった際に、二次培養を血清フリー KGM と共に毎日供給し、前述した通りにして調製した架橋コラーゲンゲルを接種するのに用いた。接種培養の KGM 媒質をフレッシュ KGM 媒質に代えた後にコラーゲンゲルを接種した。

ケラチノサイトをトリプシン／EDTA（エチレンジアミンテトラ酢酸）によって培養フラスコから放出させて改質KGM（10%FBS、1.5mMカルシウム）中の單一細胞懸濁として調製した。次いで、細胞をコラーゲンゲル基質にケラチノサイト接種密度 $3-6 \times 10^4$ 細胞/cm<sup>2</sup>で接種した。

## 細胞成長基質におけるケラチノサイトの成長

ンサートを滅菌した 2.5 % グルテルアルデヒド溶液に浸漬しつゝ 1 時間インキュベートしてコラーゲンの表面を活性化しつゝ架橋した。生成した架橋ゲルを滅菌 PBS で 3 回洗浄した。

## グルテルアルデヒド活性化コラーゲン被覆基質への成長因子の結合

前の項で調製した通りの架橋コラーゲンゲルから PBS を除いた。架橋コラーゲンゲルを次いで改質 MCDB 153 栄養媒質 (Keratinocyte Growth Medium (KGM) 、カリフォルニア、サンシエゴ在 Clonetics, Inc. : Boyce, S 及び R. Ham の米国特許 4,673,649 号) に 1.5 時間浸漬した。媒質は Epidermal Growth Factor (EGF) 及び Bovine Pituitary Extract (BPE) を含有するものであった。

1.5時間した後に、媒質を取り出して改質KGM溶液に代えた。10% Fetal Bovine Serum (FBS) 及び水中組織培養グレード塩化カルシウムの200mM原液からの1.5mM塩化カルシウムを加えてKGM溶液を改質した。次いで、コ

接種したコラーゲンゲル基質を37℃においてインキュベートした。培養を浸漬培養として保ちかつ改質KGMのフレッシュ溶液(10% FBS、1.5 mMカルシウム)を毎日補給した。

ケラチノサイト細胞は24時間以内でコラーゲン基質に結合した。細胞の漫濱培養は成長して融合性単層になり、4～8日で層化し始めた。また、培養は4～8日で約150～200オーム・ $\text{cm}^2$ の相当の電気抵抗を示した。これは、ケラチノサイト細胞シートが均一でありかつ凝集性であることを示すものであった。培養を4～8日で空気／液体界面に上げて更に培養を分化及び角質化させた。

第1図及び第2図は空気／液体界面に14日間上げたケラチノサイトのトランスマッショントラップ写真である。顕微鏡写真はケラチノサイト細胞（すなわち、外皮）の層化した、末端分化したシートを示す。シートは、空気／液体界面において、ヒト外皮に特徴的なエンベロープをインピボで角化していた。空気／液体界面の何層か下の

細胞はケラチノヒアリングラニュール（稠密な黒色細胞内体）を含有する。また、多数のデスマーソル接合部もある。コラーゲンケル界面におけるシートの基底部分に（第2図）、円滑な基底膜がある。基底膜の内部に、多数のケラチンフィラメント及びミトコンドリアがある。基底膜のすぐ下に、底膜の形式である黒い線が超微細構造に現われる。

第3図は、上述した通りにして架橋コラーゲン被覆細胞成長基質（Millipore-CM 微孔性膜）において成長させたケラチノサイトの均一シートのヘマトキシリン及びエロシン染色された組織学的断面を示す。ケラチノサイト細胞及びコラーゲンは均一な厚さであることを注記する。同様の実験で、（結果を示さない）、ケラチノサイト細胞を未改質、未架橋のコラーゲン被覆細胞成長基質（Millipore-CM 微孔性膜）において成長させた。基質の組織学的断面はケラチノサイト細胞の崩壊されたマスを示した。加えて、細胞マス下のコラーゲンは菲薄化しているように見えた。この

及び固い結合（MDCK細胞において）及び層化（NHEK細胞において）を特徴とする分化したインビボ様超微細構造を示した。MDCK細胞を、接種して4日した後に、毒物学研究用に集合して用いた。NHEK細胞を接種後8日して同様の研究に用いた。

#### 細胞染色

Rhodamine 123（ミトコンドリアの染色）をEarles Balanced Salt Solution（EBSS、10  $\mu$ g/ml）に希釈した。両方の細胞タイプをローダミン溶液によって室温において1時間染色した。細胞を洗浄した後に細胞毒性試験をした。

BCECF-AM（6-カルボキシフルオレセインシアセテートの類似物及び生育可能な細胞の細胞内蛍光性染色：オレゴン、ユージーン、Molecular Probes, Inc.）を血清フリー、フェノールレッドフリーのDulbecco's Modified Eagle Medium（DMEM）に希釈して（40  $\mu$ g/ml）両方の細胞タイプを室温において35分間染色するのに用

ることはコラゲナーゼ分解を示し得る。

#### 例2. インヒトロ毒物学研究

##### 細胞培養

Madin-Darby Canine Kidney 細胞（MDCK, ATCC No. 34）を Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)において10% FBSで培養した。正常のヒト表皮ケラチノサイト（NHEK）（カリフォルニア、サンシエゴ在 Clonetics, Inc.）を10% FBS及び1.7 mMカルシウムを有するKGMにおいて培養した。両方の細胞タイプを、Biopore（商標）膜（マサチューセッツ、ペドフォード在 Millipore Corporation）を有するコラーゲン被覆微孔性 Millipore-CM 培養プレートインサートにおいて成長させた。コラーゲン被覆微孔性膜を例1に記載する通りにして調製した。両方の細胞タイプを $5 \times 10^4$ 細胞/cm<sup>2</sup>で接種した。

コラーゲン被覆膜において成長させたMDCK及びNHEKは、立方体様形態学、基底核、デスマーソーム

いた。細胞をすすいだ後に細胞毒性試験をした。

#### 細胞毒性試験及び検出

塩化第二水銀か或は塩化カドミウムのいずれかのEBSSにおける希釈溶液（0～100  $\mu$ M）を先端膜表面にのみ適用した。同様の実験で、1%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）か或はTween 20（ミズーリ、セントルイス在 Sigma Chemical）のいずれかのDMEMにおいて希釈溶液を先端膜にのみ適用した。

細胞毒性の指示薬としての染料解放を、Fluoroskan II Spectrofluorimeter（バージニア、マクリーン在 Flow Labs, Inc.）を使用して測定した。解放された蛍光染料を含有する上層を、直接、励起波長485 nm及び放出波長538 nmを用いて読んだ。

#### 細胞毒性結果

ローダミン123、カルボキシフルオレセインシアセテート類似物等の蛍光プローブの投与量応答発散を、先端区画に放出された蛍光を定量して測定した。発散はミトコンドリアの毒性並びにに

重金属（すなわち、塩化第二水銀或は塩化カドミウム）及び洗浄剤（すなわち、SDS 或は Tween）に反応した細胞膜損傷の度合を表わすものであった。

ローダミン123プローブによって、ミトコンドリアの毒性は血漿膜完全性の崩壊に先立った。BCECF-AMの蛍光プローブを使用して、激しい先端血漿膜損傷を先端区画への蛍光の放出によって観測した。広範囲にわたる膜損傷は、先端及び基底の両方の区画への蛍光の放出によって示される。

10% SDSについてのアセイ感度は10000における1の希釈度に達した。

第4図は種々の濃度のSDSに暴露させたケラチノサイト細胞の投与量応答カーブを先端及び基底膜について示す。ケラチノサイトシートをコラーゲン被覆微孔性膜において成長させ、カルボキシフルオレセイン類似物である蛍光染料C-1354（オレゴン、ユーシーン、Molecular Probes, Inc.）で染色した。蛍光を選択及び基底区画において測定して細胞への損傷を評価した。

す図面に代えた写真である。

第4図は発明の方法に従いつつ種々の濃度のドデシル硫酸ナトリウム（SDS）に暴露させたコラーゲン被覆微孔性細胞成長用基質で成長させたケラチノサイト細胞についての投与量応答カーブを示す。

代理人の氏名 金内基弘  
同 風間 弘志

#### 均等物

当業者ならば、せいぜい日常の実験を用いて、本明細書中に記載する発明の特定の実施態様の多くの均等物を認識し、或は確認することができるものと思う。これらや他のすべての均等物を特許請求の範囲に包含する意図である。

#### 4.図面の簡単な説明

第1図は本発明の方法にしたがって成長させた角化エンベロープを有するケラチノサイトシートの空気／液体界面を示す、生物の形態を表わす図面に代えたトランスマッショントン電子顕微鏡写真（TEM）である。

第2図は第1図に示すケラチノサイトシートの基底部分を示す、生物の形態を表わす図面に代えたTEMである。

第3図は本発明に従って作った改質した架橋コラーゲン被覆細胞成長基質で成長させたケラチノサイトの均一シートのヘマトキシリソ及びエオシン染色した組織的学断面を示す生物の形態を表わす図面に代えた写真である。

図面の添付(内容に変更なし)

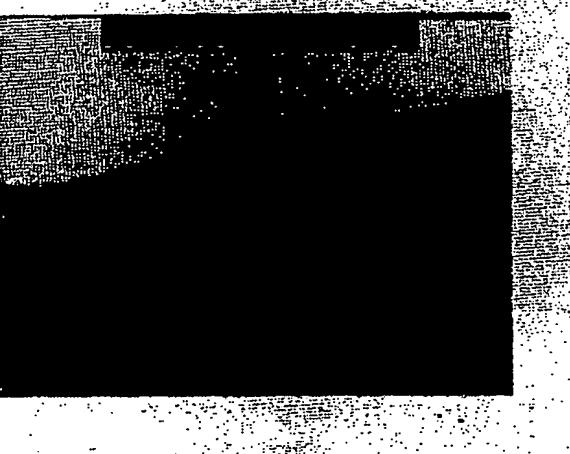


FIG.1

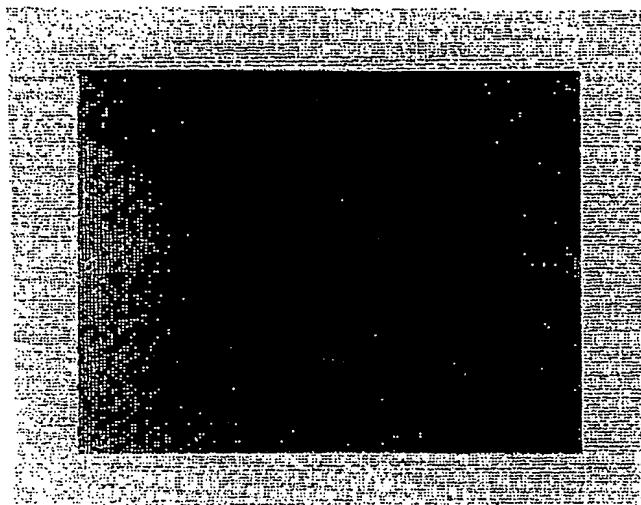


FIG. 2



FIG. 3

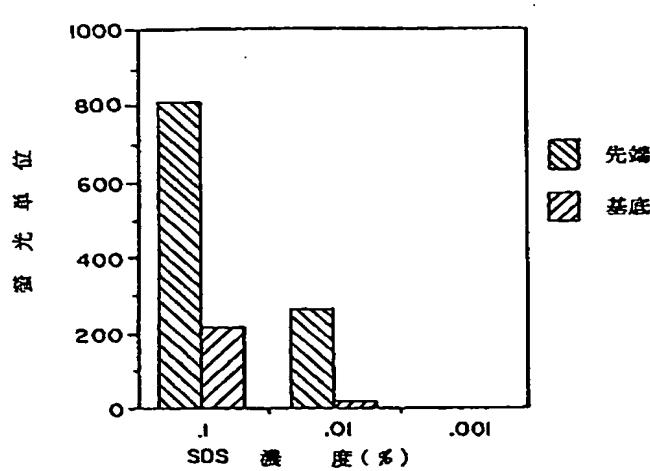


FIG. 4

手続補正書 (方式)  
 平成2年11月15日

特許庁長官 植松 敏 殿  
 事件の表示 平成2年特許願第115346号

発明の名称 細胞組織の増殖方法

補正をする者  
 事件との関係  
 特許出願人  
 名称 ミリポア・コーポレイション

代理人  
 〒103  
 住所 東京都中央区日本橋3丁目13番11号  
 油脂工業会館3階 (電話273-6436番)  
 氏名 (6781) 弁理士 倉内 基  
 同  
 住所 同上  
 氏名 (8577) 弁理士 風間 弘

補正命令通知の日付 平成2年7月31日

補正の対象  
 明細書  
 図面  
 1 通

補正の内容 別紙の通り  
 明細書及び図面の添書 (内容に変更なし)

人材社

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成5年(1993)10月5日

【公開番号】特開平3-164168

【公開日】平成3年(1991)7月16日

【年通号数】公開特許公報3-1642

【出願番号】特願平2-115346

【国際特許分類第5版】

C12N 5/08

【F I】

C12N 5/00 E 7236-4B

手続補正書

平成4年11月10日

特許庁長官 麻生 渡 殿

事件の表示 平成2年特許第115346号

発明の名称 細胞組織の増殖方法

補正をする者

事件との関係 特許出願人  
名 称 ミリポア・コーポレイション

代 理 人

〒103

住 所 東京都中央区日本橋3丁目13番11号  
油脂工業会館3階(電話 3273-6436番)

氏 名 (6781) 弁理士 倉 内 基 弘  
同

住 所 同 上

氏 名 (8577) 弁理士 風 間 弘 志

補正の対象

明細書の特許請求の範囲・発明の詳細な説明・  
図面の簡単な説明の欄

補正の内容 別紙の通り

1. 特許請求の範囲を別紙の通り訂正する。

2. 平成2年11月16日提出の手続補正書に添付した明細書第6頁第4~5行の「代謝活性」を「代謝的に活性」に訂正する。

3. 同明細書第7頁第4行の「融合性」を「集密的 (confluent)」に訂正する。

4. 同明細書第7頁下から8行目の「感心」を「関心」に訂正する。

5. 同明細書第8頁第5行及び第7行の「融合性」を「集密的」に訂正する。

6. 同明細書第8頁第8行及び第14行の「末端分化」を「最終分化」に訂正する。

7. 同明細書第8頁下から3行目の「基質」を「物質」に訂正する。

8. 同明細書第9頁下から9~8行目の「末端分化」を「最終分化」に訂正する。

9. 同明細書第9頁下から8行目の「融合性」を「集密的な」に訂正する。

10. 同明細書第11頁下から9行目の「感心」を「関心」に訂正する。

1 1. 同明細書第12頁第8行及び第11行の「  
感心」を「関心」に訂正する。

1 2. 同明細書第13頁下から8行目の「感心」  
を「関心」に訂正する。

1 3. 同明細書第15頁下から5行目の「末端分  
化」を「最終分化」に訂正する。

1 4. 同明細書第16頁第9、10、13、16、  
17及び19行の「基質」を「物質」に訂正す  
る。

1 5. 同明細書第16頁下から8行目、8～7行  
目及び5行目の「反応」を「応答」に訂正す  
る。

1 6. 同明細書第16頁下から4～3行目の「末  
端分化」を「最終分化」に訂正する。

1 7. 同明細書第17頁第7行及び第10行の「  
感心」を「関心」に訂正する。

1 8. 同明細書第17頁第10行の「基質」を「  
物質」に訂正する。

1 9. 同明細書第17頁下から8行目の「末端分  
化」を「最終分化」に訂正する。

2 0. 同明細書第18頁第2行の「基質」を「物  
質」に訂正する。

2 9. 同明細書第21頁第10行及び12行の「  
ゲルを接種」を「ゲルに接種」に訂正す  
る。

3 0. 同明細書第21頁下から6行目の「放出」  
を「遊離」に訂正する。

3 1. 同明細書第22頁第6～7行の「融合性」  
を「集密的」に訂正する。

3 2. 同明細書第22頁下から6行目の「トラン  
スマッショーン」を「透過型」に訂正す  
る。

3 3. 同明細書第22頁下から4行目の「(すな  
わち、外皮)」を削除する。

3 4. 同明細書第22頁下から4行目の「末端分  
化」を「最終分化」に訂正する。

3 5. 同明細書第22頁下から3行目の「シート  
を示す」を「シート(すなわち、表皮)を示す」  
に訂正する。

3 6. 同明細書第22頁下から2～1行目の「ヒ  
ト外皮に特徴的なエンベロープをインビボで角化  
していた」を「インビボにおいてヒト表皮に特徴  
的な角化した外被を有していた」に訂正す  
る。

3 7. 同明細書第23頁第2～3行の「デスマー

質に訂正する。

2 1. 同明細書第18頁第10行の「ラット尾タ  
イプI」を「ラット尾由来コラーゲンタイプI」  
に訂正する。

2 2. 同明細書第18頁下から9行目の「からの  
コラーゲン」を削除する。

2 3. 同明細書第18頁下から8行目の「渦」を  
「ボルテックスミキサー」に変更する。

2 4. 同明細書第20頁下から3行目の「水中」  
を削除する。

2 5. 同明細書第20頁下から2行目の「原液」  
を「原液(水溶液)」に訂正する。

2 6. 同明細書第21頁第2行の「急冷し」を「  
消失させ」に訂正する。

2 7. 同明細書第21頁第4行の「を接種する」  
を「への接種」に訂正する。

2 8. 同明細書第21頁第7～9行の「培養が6  
0～80%の・・・と共に毎日供給し、」を「二  
次培養に血清フリーKGMを毎日供給し、」に訂  
正する。

2 9. 「サル」を「デスマソーム」に訂正す  
る。

3 0. 同明細書23頁第7行の「底膜の形式」を  
「基底膜の形成」に訂正する。

3 1. 同明細書23頁下から9行目の「エロシン」  
を「エオシン」に訂正する。

3 2. 同明細書第23頁下から2行目の「マス」  
を「塊」に訂正する。

3 3. 同明細書第24頁第4行の「Canine Kidne  
y」を「イヌ腎臓」に訂正する。

3 4. 同明細書第24頁第5～6行の「Dulbecco  
's Modified Eagle's Medium(DMEM)において10  
%FBSで」を「10%FBSを含むダルベッコ  
変形イーグル培地で」に訂正する。

3 5. 同明細書第24頁下から1行目の「形態学」  
を「形態」に訂正する。

3 6. 同明細書第25頁第1行の「固い結合」を  
「密着結合」に訂正する。

3 7. 同明細書第25頁第4行の「母物学」を「  
細胞毒性の」に訂正する。

3 8. 同明細書第25頁第4行の「集合して」を

「集密状態 (confluence) で」に訂正する。

47. 同明細書第25頁第9行の「Earle's Balanced Salt Solution」を「アールの平衡塩溶液」に訂正する。

48. 同明細書第25頁下から6行目の「類似物及び」を「アナログである」に訂正する。

49. 同明細書第25頁下から5行目の「染色」を「染色剤」に訂正する。

50. 同明細書第25頁下から3行目の「Dulbecco's Modified Eagle's Medium」を「ダルベッコ改変イーグル培地」に訂正する。

51. 同明細書第26頁第4～5行の「先端」を「先端 (apical)」に訂正する。

52. 同明細書第26頁第10行及び第13行の「解放」を「放出」に訂正する。

53. 同明細書第26頁下から1行目の「ミトコンドリアの」を「ミトコンドリア」に訂正する。

54. 同明細書第26頁下から1行目の「並びにに」を「並びに」に訂正する。

55. 同明細書第27頁第5～6行の「ミトコン

## 「2. 特許請求の範囲

- 1種の細胞タイプからインピトロで組織を製造する方法であって、
  - 細胞を成長させるのに適した多孔性基質に、該細胞をインピトロで成長させる特異的成長因子を接触させ、
  - 次いで、多孔性基質に細胞を接種し、
  - 接種した多孔性基質を細胞成長に適した条件下に保ち、それで集密的細胞単層の組織或は均一に分化した多層組織を製造する工程を含む方法。
- 多孔性基質にコラーゲンを被覆する特許請求の範囲第1項記載の方法。
- 更に、
  - 細胞を成長させるのに適した多孔性基質を処理し、それで成長因子を結合させるための活性化部位をもたらし、
  - 多孔性基質に該細胞を成長させる特異的成長因子を含む細胞培養培地を、成長因子を基質内に分散させる条件下で接触させ、

ドリアの」を「ミトコンドリア」に訂正する。

56. 同明細書第27頁第6行の「血漿膜完全性」を「原形質膜の集結性」に訂正する。

57. 同明細書第27頁第8行の「血漿膜」を「原形質膜」に訂正する。

58. 同明細書第27頁下から2行目の「選択」を「先端」に訂正する。

59. 同明細書第28頁第9行の「エンベロープ」を「外被」に訂正する。

60. 同明細書第28頁第11行の「ransミッショーン」を「透過型」に訂正する。

61. 同明細書第28頁下から1行目の「組織的学」を「組織学的」に訂正する。

c. 基質から培地を取り去って培地フリー基質とし、

d. 培地フリー基質に成長因子及び非特異性たんぱく質を含む細胞培養培地を、残留する活性化部位を飽和する程の量で接触させ、  
e. 次いで、多孔性基質に細胞を接種し、  
f. 接種した多孔性基質を細胞成長に適した条件下に保ち、それで集密的細胞単層の組織或は均一に分化した多層組織を製造する工程を含む特許請求の範囲第1項記載の方法。

4. 特許請求の範囲第1項記載の方法によって製造された組織。

5. 1種の細胞タイプから組織を成長させるための基質の製造方法であって、

- ポリマー微孔性基質を処理し、それで成長因子を結合させる活性化部位をもたらし、
- 微孔性基質に該細胞を成長させる特異的な成長因子を含む細胞培養培地を、成長因子を基質内に分散させる条件下で接触させ、
- 基質から培地を取り去って培地フリー基質

とし、

d. 培地フリー基質に成長因子及び非特異性たんぱく質を含む細胞培養培地を残留する活性化部位を飽和するのに十分な量で接觸させ、それで緻密的細胞単層の組織或は均一に分化した多層組織を成長させるための基質を製造する

工程を含む方法。

6. 微孔性基質がコラーゲンを被覆した微孔性膜である特許請求の範囲第5項記載の方法。

7. 特許請求の範囲第5項記載の方法によって製造された細胞から組織を成長させるための基質。

8. 物質が組織に与える毒性作用を求める方法であって、

a. 特許請求の範囲第1項記載の方法によって製造された細胞を成長させる特異的な成長因子を有する細胞を成長させるのに適した微孔性基質において成長させた細胞から組織をもたらし、

b. ある量の物質を組織に施して物質への細胞の応答を観測し、

c. 応答を評価して物質の毒性作用を求める工程を含む方法。

9. 下記を含むインビトロ毒物学用キット：

a. 関心のある細胞を成長させるための特異的な成長因子を中心分散させた多孔性細胞成長基質

b. 基質上で成長させた関心のある細胞からの組織、又は細胞成長基質に接種し、成長させ、それで細胞成長の任意の所望の段階で組織を產生することができる細胞の懸濁

c. 物質の毒性を求める試薬。

10. 基質が微孔性細胞成長基質に被覆した架橋コラーゲンゲルであり、かつ細胞が成長して最終分化組織を产生するケラチノサイト細胞である、特許請求の範囲第9項に記載のキット。

」

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

**BLACK BORDERS**

**IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

**FADED TEXT OR DRAWING**

**BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

**SKEWED/SLANTED IMAGES**

**COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

**GRAY SCALE DOCUMENTS**

**LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

**REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

**OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image  
problems checked, please do not report these problems to  
the IFW Image Problem Mailbox.**